

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

PCT
NOTIFICATION D'ELECTION
(règle 61.2 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année)
04 juillet 2001 (04.07.01)

Destinataire:
Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Demande internationale no PCT/FR00/02420	Référence du dossier du déposant ou du mandataire SLhr712/10
Date du dépôt international (jour/mois/année) 01 septembre 2000 (01.09.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 03 septembre 1999 (03.09.99)
Déposant DURAND, Patrick etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

30 mars 2001 (30.03.01)

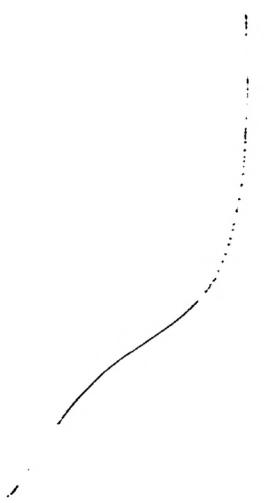
dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télecopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Cécile Chatel (Fax 338.87.40) no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/09/01/76

6

Applicant's or agent's file reference SLhr712/10	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02420	International filing date (day/month/year) 01 September 2000 (01.09.00)	Priority date (day/month/year) 03 September 1999 (03.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 35/56		
Applicant INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 30 March 2001 (30.03.01)	Date of completion of this report 13 November 2001 (13.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02420

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-4, 6, 9-11	YES
	Claims	1, 5, 7-8, 12	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-12	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The applicant's observations were duly considered.

1. Reference is made to the following documents:

- D1: DATABASE WPI Section Ch, Week 197413 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D12, AN 1974-23535V XP002140617 & JP A 48 022661 (MATSKURA K), 23 March 1973 (1973-03-23)
- D2: DATABASE WPI Section Ch, Week 199521 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-158876 XP002140618 & JP A 07 082132 (MIKIMOTO SEIYAKU KK), 28 March 1995 (1995-03-28)
- D3: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Vol. 1995, No. 07, 31 August 1995 (1995-08-31) & JP A 07 102252 (MIKIMOTO PHARMACEUT CO LTD), 18 April 1995 (1995-04-18)
- D4: DATABASE WPI Section Ch, Week 199846 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1998-537367 XP002140619 & JP A 10 236941 (NOEVIR KK), 8 September 1998 (1998-09-08)

Novelty - PCT Article 33(1) and (2)

2. Claims 1, 5, 7-8 and 12 are not novel for the



following reasons:

2.1 D1 describes the preparation of an oyster flesh enzymatic hydrolysate (proteinase). There is no technical difference between the hydrolysate in D1 and that of Claims 1, 5, 7-8 and 12 of the present application.

D1 does not mention the use of said hydrolysate for preparing a composition for eliminating free radicals.

Nevertheless, the fact that the composition has free radical eliminating activity is a mere observation of the activity of said composition, and is not technically different from that of D1.

Claims 1, 5, 7-8 and 12 do not meet the conditions under PCT Article 6 in that the object for which protection is sought is not clearly defined. The claims attempt to define this object by the result to be obtained, which is essentially equivalent to stating the fundamental problem that the invention is to resolve (obtaining a free radical eliminating composition). The technical properties needed to obtain this result and solve this problem are absent. Thus, no technical distinction exists between the composition in D1 and that of Claims 1, 5, 7-8 and 12 of the present application. Thus defined, Claims 1, 5, 7-8 and 12 are therefore not novel per D1.

2.2 Claims 2-4, 6, and 9-11 are novel in view of the prior art documents cited in the search report.

The novel features are: the use of a proteinase from among subtilisin, pepsin and trypsin; at least 30% of protein hydrolysis; and draining of oyster flesh.

INVENTIVE STEP - PCT Article 33(1) and (3)

- 3 **Claims 1-12 do not involve an inventive step for the following reasons:**

3.1 The closest prior art document is D2 and/or D3 (eliminating radicals via oyster mucus enzymatic hydrolysate), either through the documents cited in the present application's description (eliminating free radicals using lyophilisates and/or aqueous oyster flesh extracts).

The present application differs from the closest prior art in that the enzymatic hydrolysates are obtained from oyster flesh.

The technical result of the present application is greater free radical elimination than in previously described techniques.

The objective problem in the present application is to provide alternative oyster extracts with free radical eliminating properties.

3.2 In view of Documents D2 and/or D3, it would have been obvious for a person skilled in the art also prepare an oyster flesh enzymatic hydrolysate in order to obtain a free radical eliminating composition, given that the free radical eliminating activity of oyster extracts other than enzymatic extracts was already well-established (see the



description in the present application) and enzymatic hydrolysates (of oyster mucus) had already been obtained (D2 and/or D3) for the same purpose.

The enzymatic hydrolysis of oyster flesh is an obvious alternative to the known extraction methods (aqueous extraction; freeze-drying), in the light of D2 and/or D3.

The use of pepsin, subtilisin, or trypsin is only one of the obvious possibilities from which a person skilled in the art could choose depending on the circumstances and in the light of D1 (use of papain), without being inventive [Claims 2 and 9-11d].

Also, the features of Claims 3, 4 and 6 [as well as 9b); 9c); 10b) and 10c); 11b) and 11c)] are only some of the obvious possibilities from which a person skilled in the art could choose depending on the circumstances, without being inventive, by applying simple experimental procedures that are routine for a person skilled in the art.

3.3 Claims 1-12 thus do not involve an inventive step.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02420

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- the international application as originally filed.
- the description, pages 1-18,20-24, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages 19, filed with the letter of 24 October 2001 (24.10.2001),
pages _____, filed with the letter of _____.
- the claims, Nos. 1-12, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- the description, pages _____
- the claims, Nos. _____
- the drawings, sheets/fig _____

3. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 15 NOV 2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire SLhr712/10	POUR SUITE A DONNER	voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR00/02420	Date du dépôt international (<i>jour/mois/année</i>) 01/09/2000	Date de priorité (<i>jour/mois/année</i>) 03/09/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K35/56		
Déposant INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR ...		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 1 feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 		

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 30/03/2001	Date d'achèvement du présent rapport 13.11.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Fayos, C N° de téléphone +49 89 2399 2180



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02420

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initiallement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-18,20-24	version initiale
19	reçue(s) avec télécopie du 24/10/2001

Revendications, N°:

1-12	version initiale
------	------------------

Dessins, feuilles:

1/1	version initiale
-----	------------------

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02420

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
- des revendications, n°s :
- des dessins, feuilles :

5. Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 2-4, 6, 9-11 Non : Revendications 1, 5, 7-8, 12
Activité inventive	Oui : Revendications - Non : Revendications 1-12
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-12 Non : Revendications -

2. Citations et explications
voir feuille séparée

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SÉPARÉE**

Demande internationale n° PCT/FR00/02420

Les observations du déposant ont été dûment considérées.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventiv et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui d cette déclaration

1- Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: DATABASE WPI Section Ch, Week 197413 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D12, AN 1974-23535V XP002140617 & JP 48 022661 A (MATSUMURA K), 23 mars 1973 (1973-03-23)
- D2: DATABASE WPI Section Ch, Week 199521 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-158876 XP002140618 & JP 07 082132 A (MIKIMOTO SEIYAKU KK), 28 mars 1995 (1995-03-28)
- D3: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 07, 31 août 1995 (1995-08-31) & JP 07 102252 A (MIKIMOTO PHARMACEUT CO LTD), 18 avril 1995 (1995-04-18)
- D4: DATABASE WPI Section Ch, Week 199846 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1998-537367 XP002140619 & JP 10 236941 A (NOEVIR KK), 8 septembre 1998 (1998-09-08)

NOUVEAUTÉ - Art. 33 (1) et (2) PCT

2- **Les revendications 1, 5, 7-8 et 12 ne sont pas nouvelles pour les raisons suivantes:**

2.1- D1 décrit la préparation d'un hydrolysat enzymatique (proteinase) de chair d'huître. Il n'y a pas de différence technique entre l'hydrolysat de D1 et celui des revendications 1, 5, 7-8 et 12 de la présente demande.

D1 ne fait pas référence à l'utilisation dudit hydrolysat pour la préparation d'une composition à activité antiradicalaire.

Cependant, le fait que la composition aie une activité antiradicalaire est une simple observation de l'activité de la dite composition, qui n'est pas techniquement différente de celle de D1.

Les revendications 1, 5, 7-8 et 12 ne satisfont pas aux conditions requises à l'article 6 PCT, dans la mesure où l'objet pour lequel une protection est recherchée n'est pas clairement défini. Les revendications tentent de définir cet objet par le résultat à atteindre, ce qui revient simplement à énoncer le problème fondamental que doit résoudre l'invention (obtenir une composition à activité antiradicalaire). Les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat et résoudre le problème sont absentes. Il n'y a donc aucune différence technique entre la composition de D1 et celle des revendications 1, 5, 7-8 et 12 de la présente demande. Ainsi définies, les revendications 1, 5, 7-8 et 12 ne sont donc pas nouvelles au vu de D1.

- 2.2- Les revendications 2-4, 6 et 9-11 sont nouvelles au vu des documents de l'art antérieur cités dans le rapport de recherche.

La caractéristique nouvelles sont: l'utilisation d'une protéase choisie parmi la subtilisine, la pepsine et la trypsine, degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 30%, et l'opération d'égouttage de la chair d'huîtres.

ACTIVITÉ INVENTIVE - Art. 33 (1) et (3) PCT

- 3- **Les revendications 1-12 ne présentent pas d'activité inventive pour les raisons indiquées ci-dessous:**

- 3.1- L'art antérieur le plus proche est représenté par soit D2 et / ou D3 (activité antiradicalaire d'hydrolysats enzymatiques de mucus d'huîtres), soit par les documents cités dans la description de la présente demande (activité antiradicalaire de lyophylisats et / ou d'extraits aqueux de chair d'huître).

La présente demande diffère de l'art antérieur le plus proche par le fait que les hydrolysats enzymatiques sont obtenus à partir de chair d'huître.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE**

Demande internationale n° PCT/FR00/02420

L'effet technique de la présente demande est l'obtention d'une activité radicalaire plus élevée que celles décrites précédemment.

Le problème objectif posé dans la présente demande est de fournir des extraits d'huîtres alternatifs ayant une activité antiradicalaire.

- 3.2- Au vu de D2 et / ou D3, il aurait été évident pour l'homme du métier de préparer aussi un hydrolysat enzymatique de chair d'huître, en vue d'obtenir une composition antiradicalaire, étant donné que l'activité antiradicalaire d'extraits d'huîtres autres que des extraits enzymatiques était déjà bien établie (voir la description de la présente demande) et que des hydrolysats enzymatiques (de mucus d'huîtres) avaient déjà été obtenus (D2 et / ou D3) aux mêmes fins.

L'hydrolyse enzymatique de chair d'huître, est une alternative évidente aux procédés d'exactions déjà connus (extraction aqueuse; lyophilisation), au vu de D2 et / ou D3.

L'utilisation de la pepsine, subtilisine ou trypsine est seulement une des possibilités que la personne du métier pourrait choisir, selon le cas d'espèce, parmi plusieurs possibilités évidentes, au vu de D1 (utilisation de la papaïne), sans qu'une activité inventive soit impliquée (revendications 2 et 9-11 d)).

De même, les caractéristiques des revendications 3, 4 et 6 (ainsi 9 b) et c), 10 b) et c) et 11 b) et c)) sont seulement certaines des possibilités que la personne du métier pourrait choisir, selon le cas d'espèce, parmi plusieurs possibilités évidentes, sans qu'une activité inventive soit impliquée, en appliquant de simples procédures expérimentales de routine pour l'homme du métier.

- 3.3- Les revendications 1-12 ne présentent donc pas d'activité inventive.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire SLhr712/10	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/ FR 00/ 02420	Date du dépôt international (<i>jour/mois/année</i>) 01/09/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (<i>jour/mois/année</i>) 03/09/1999
Déposant INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR ...		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
 - la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
 - contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
 - déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
 - remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
 - La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
 - La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

- 2. Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
- 3. Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- Le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégué,

- Le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- Le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégué est la Figure n°

- suggérée par le déposant.
- parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/02420

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K35/56 A61K38/01 A61K7/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, CANCERLIT, BIOSIS, LIFESCIENCES, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 197413 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D12, AN 1974-23535V XP002140617 & JP 48 022661 A (MATSUMURA K), 23 mars 1973 (1973-03-23) abrégé ---</p>	1-12
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199521 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-158876 XP002140618 & JP 07 082132 A (MIKIMOTO SEIYAKU KK), 28 mars 1995 (1995-03-28) --- -/-</p>	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/R 00/02420

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 07, 31 août 1995 (1995-08-31) & JP 07 102252 A (MIKIMOTO PHARMACEUT CO LTD), 18 avril 1995 (1995-04-18) ---	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 199846 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1998-537367 XP002140619 & JP 10 236941 A (NOEVIR KK), 8 septembre 1998 (1998-09-08) ---	
A, P	DATABASE WPI Section Ch, Week 200036 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-420753 XP002153646 & NZ 329 018 A (IND RES LTD), 28 avril 2000 (2000-04-28) -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 00/02420

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 48022661	A	07-07-1973	NONE	
JP 7082132	A	28-03-1995	NONE	
JP 07102252	A	18-04-1995	NONE	
JP 10236941	A	08-09-1998	NONE	
NZ 329018	A		NONE	

Le Tableau II montre que l'hydrolysat A présente une teneur en sucres totaux supérieure à celles retrouvées dans le broyat et dans l'extrait aqueux. Cet accroissement est dû à la déstructuration des tissus provoquée par l'hydrolyse enzymatique, permettant ainsi une plus forte solubilisation des sucres. La diminution de la teneur en protéines solubles que l'on observe entre le broyat et l'hydrolysat est une conséquence de l'hydrolyse des protéines natives. Cette hydrolyse génère une quantité importante de peptides et d'acides aminés libres qui réagissent peu avec le réactif utilisé pour le dosage des protéines solubles (BCA[®]). Par contre, la teneur en matières minérales ne varie pas entre les trois préparations.

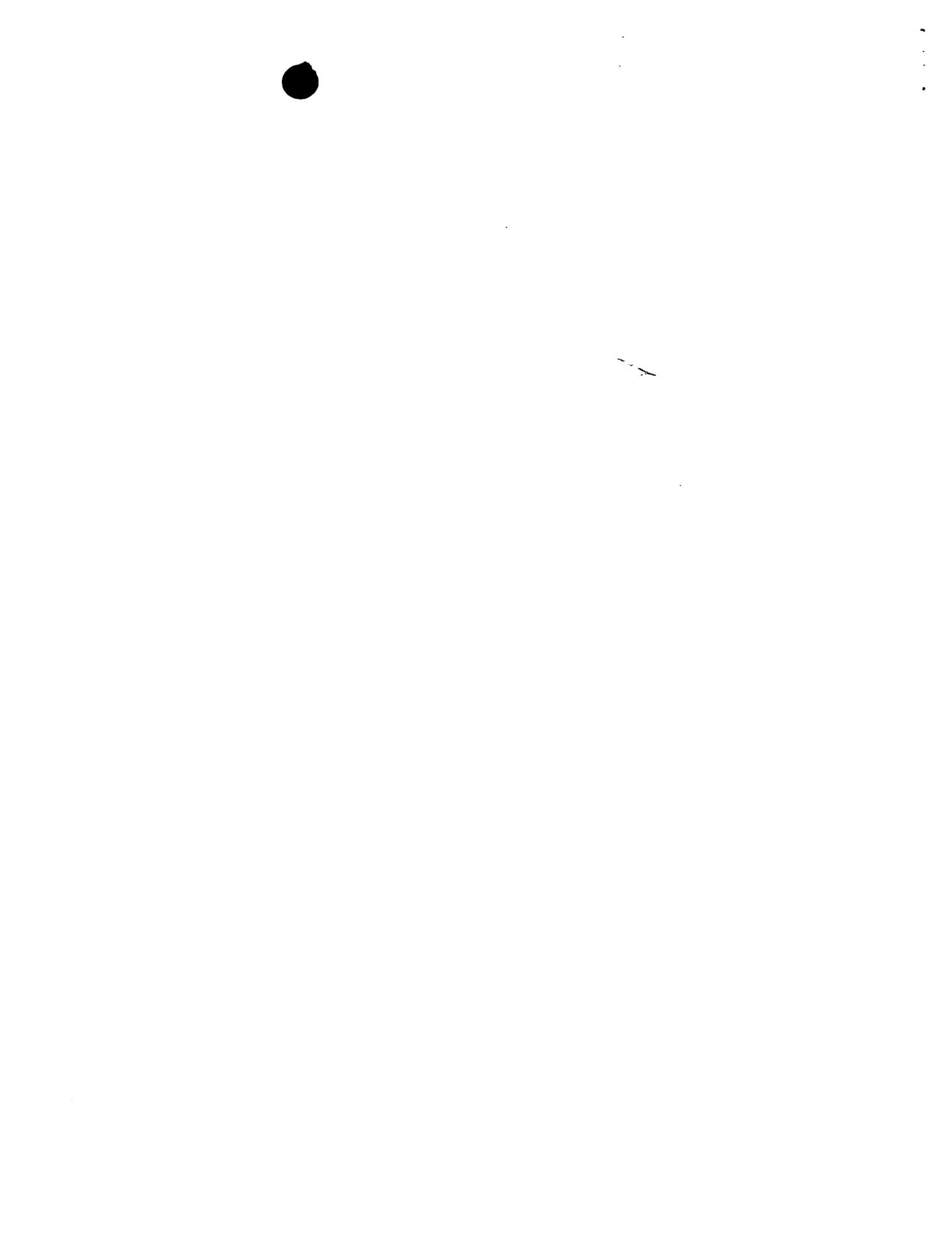
Par ailleurs, il résulte du Tableau II que la teneur en acides aminés libres de l'hydrolysat A est notablement plus élevée que la teneur en acides aminés libres de l'extrait aqueux d'huîtres, cette dernière étant très proche de celle retrouvée pour le broyat de chair d'huîtres. L'augmentation de la quantité d'acides aminés libres présents dans l'hydrolysat A est directement liée à la rupture des liaisons peptidiques provoquée par la réaction d'hydrolyse.

Toutefois, au vu du Tableau III, il apparaît que la proportion de taurine libre, qui est connue pour présenter une activité anti-oxydante, est plus faible dans l'hydrolysat A que dans l'extrait aqueux d'huîtres. En effet, la taurine sous forme libre représente 60,66% des acides aminés libres dans l'extrait aqueux d'huîtres contre seulement 19,25% dans l'hydrolysat A.

EXAMPLE 5 : Activité biologique des hydrolysats enzymatiques de chair d'huîtres obtenus conformément à l'Invention

L'activité biologique des hydrolysats A et B préparés selon l'exemple 3 est appréciée par une série d'expérimentations visant à tester :

- d'une part, l'aptitude de ces hydrolysats à inhiber l'hémolyse induite par l'introduction d'un générateur de radicaux peroxydes, à savoir le 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) dichlorhydrique (AAPH), dans une suspension d'hématies, et
- d'autre part, l'aptitude de ces hydrolysats à protéger les lipoprotéines de basse densité, plus connues sous la terminologie anglaise, "Low Density Lipoproteins" (LDL) contre une oxydation induite par le cuivre.



UTILISATION D'HYDROLYSATS ENZYMATIQUES DE CHAIR D'HUITRES POUR LA PREPARATION DE COMPOSITIONS ANTIRADICALAIRES

La présente Invention se rapporte à l'utilisation d'hydrolysats enzymatiques de chair d'huîtres pour la préparation de compositions antiradicalaires, utiles notamment en thérapeutique, en diététique et en cosmétologie.

Les radicaux libres oxygénés sont des atomes ou des molécules qui possèdent un électron non apparié au niveau de leur orbitale externe (OH^- , O_2^- , ROO^- , RO^- , ...). De ce fait, ils sont extrêmement instables et peuvent réagir avec des molécules stables telles que des lipides, des glucides, des protéines ou des acides nucléiques, éléments fondamentaux des cellules, pour appairer leur électron, réaction qui conduit à la formation en chaîne de nouveaux radicaux libres. Aussi, sont-ils susceptibles de provoquer de graves altérations cellulaires telles qu'une mutation ou un vieillissement cellulaire, voire la mort des cellules.

Au niveau cellulaire, des radicaux libres oxygénés se forment en permanence. Ils peuvent également se former au cours des mécanismes de détoxication après exposition à certaines substances ou sous l'effet de radiations. Normalement, la production endogène de radicaux libres oxygénés est contrebalancée par la présence de systèmes de défense représentés, d'une part, par des enzymes (supéroxyde dismutases, catalases, glutathion peroxydases) qui interceptent les formes actives de l'oxygène, et, d'autre part, par des "*piégeurs de radicaux libres*" (glutathion, acide urique, vitamine C, vitamine A, vitamine E, taurine, ...) qui bloquent les peroxydations en chaîne des lipides membranaires, en sorte que les organismes n'ont pas à en souffrir.

Cependant, de nombreuses situations peuvent entraîner la formation excessive de radicaux libres oxygénés : l'exposition intense au soleil, l'intoxication par certains produits chimiques et certains médicaments, l'hyperoxygénéation ou la réoxygénéation brutale de tissus préalablement privés d'oxygène, la survenue d'une réaction inflammatoire intense (brûlures, infections, ...) ou chronique. Un excès de radicaux libres oxygénés peut également être lié à une maladie génétique ou à une diminution des défenses : immaturité des systèmes enzymatiques chez les nouveau-nés, vieillissement, déficits alimentaires en vitamines et en oligo-éléments (sélénium, zinc, ...).

Quoi qu'il en soit, on impute à un déséquilibre entre la production et la destruction des radicaux libres oxygénés une responsabilité dans la genèse et l'entretien d'un certain nombre de pathologies chroniques telles que l'athérosclérose, les affections malignes, les pathologies inflammatoires (maladie de Crohn par exemple) et neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, ...) ou encore le vieillissement, ainsi que de pathologies aiguës comme les lésions de reperfusion post-ischémique, les brûlures, les chocs septiques, les infections virales, les états infectieux graves et les allergies, sans qu'il soit toujours possible de préciser si ces radicaux libres sont la cause ou la conséquence, ou les deux simultanément, de la maladie. On comprend, de ce fait, que de très nombreux travaux visent actuellement à mieux appréhender l'implication des radicaux libres oxygénés en physiopathologie et à développer des composés ou compositions propres à s'opposer aux effets délétères de ces radicaux libres.

Des Auteurs (LIVINGSTONE et al., 1990, *Funct. Ecol.*, 4, 415-424 ; REGOLI et PRINCIPATO, 1995, *Aquat. Tox.*, 31, 143-164) ont mis en évidence chez les mollusques marins, non seulement la présence de superoxydes dismutases, de catalases et de glutathion peroxydases, mais également celle d'enzymes anti-oxydantes spécifiques comme la glyoxalase qui catalyse la détoxicification des cétoaldéhydes formés au cours du stress oxydatif, et les glutathion transférases qui catalysent une grande variété de réactions de conjugaison du glutathion avec des composés xénobiotiques, signant une aptitude de ces organismes à se protéger contre les radicaux libres oxygénés. Par ailleurs, des anti-oxydants comme le glutathion, la vitamine A, la vitamine E et la taurine, ont été détectés chez les mollusques marins, et se sont montrés dans certains cas être quantitativement proportionnels au stress oxydatif subi par ces animaux.

Aussi, est-il apparu que les mollusques marins étaient susceptibles de constituer une source de composés antiradicalaires utilisables dans la prévention et le traitement des effets néfastes des radicaux libres oxygénés.

Un certain nombre d'Auteurs se sont plus spécialement intéressés aux potentiels antiradicalaires d'extraits d'huîtres. Notamment :

– TAPIERO et TEW (*Biomed. & Pharmacother.*, 1996, 50, 149-153) ont étudié les effets d'un lyophilisat d'huîtres dénommé JCOE (JAPAN CLINIC Oyster Extract) sur la teneur intracellulaire en hormone stimulant le glutathion (GSH), ainsi que sur l'activité de la glutathion-S-transférase (GST), d'une culture de cellules HL60. Ce lyophilisat est obtenu en chauffant à 80°C pendant 1 heure de la chair d'huîtres, puis en soumettant le produit résultant à une centrifugation et en lyophilisant le surnageant ainsi recueilli. TAPIERO et TEW ont ainsi mis en évidence une augmentation significative de la synthèse de la GSH chez les cellules HL60 cultivées en présence du lyophilisat, sans toutefois noter de modification significative de l'activité de la GST.

– YOSHIKAWA et al. (*Biomed. & Pharmacother.*, 1997, 51, 328-332) ont montré qu'un lyophilisat d'huîtres JCOE est capable *in vitro* de piéger les radicaux superoxydes et hydroxyles, et de protéger des cellules de la muqueuse gastrique de rats contre les effets délétères du peroxyde d'hydrogène, lorsque ces cellules sont prétraitées pendant 24 heures par ce lyophilisat.

– KIMURA et al. (*Journal of Ethnopharmacology*, 1998, 59, 117-123) ont montré que des rats nourris avec de l'huile de maïs peroxydée et recevant, deux fois par jour et par voie orale, un extrait aqueux d'huîtres, présentent des taux sériques en acides gras libres, triglycérides et peroxydes lipidiques, et un taux hépatique en cholestérol total moins élevés que ceux observés chez des rats nourris de la même façon mais ne recevant pas d'extrait aqueux d'huîtres. Par ailleurs, ces Auteurs ont mis en évidence la présence, dans cet extrait aqueux, d'une substance capable à la fois d'inhiber la lipolyse induite par l'adrénaline et de stimuler la lipogenèse à partir du glucose dans des cellules adipeuses de rats, et qu'ils ont identifiée comme étant de l'adénosine.

– NOMURA et al. ont proposé, dans la Demande de Brevet Européen publiée sous le n° 0 806 465 au nom de JAPAN CLINIC Co. Ltd, de préparer une composition anti-oxydante par un procédé consistant à fractionner par de l'éthanol un extrait aqueux d'huîtres préalablement obtenu en chauffant un mélange de chair d'huîtres et d'eau à une température comprise entre 50 et 90°C pendant 2 à 3

heures. Les propriétés anti-oxydantes de la composition ainsi préparée sont mises en évidence, dans cette Demande de Brevet, par le biais de tests visant à apprécier son aptitude à inhiber *in vitro* la réaction entre des anions superoxydes produits par un système enzymatique xanthine-xanthine oxydase et le 5,5-diméthyl-1-pyrrolen-1-oxyde.

– DUSSART (*Rapport IFREMER : Stage de VIème Année*, 1997, Faculté de Pharmacie, UNIVERSITE DE LILLE II) a réalisé une étude visant à comparer les propriétés antiradicalaires d'extraits aqueux d'huîtres préparés en mélangeant un broyat de chair d'huîtres avec de l'eau désionisée, puis en soumettant le mélange résultant à une centrifugation suivie d'une lyophilisation du surnageant, avec celles présentées par des extraits d'huîtres préparés en soumettant un broyat d'huîtres uniquement à une lyophilisation. Les résultats de cette étude montrent que, si les deux types d'extraits d'huîtres ont *in vitro* un effet protecteur contre les oxydations induites d'une part, par un générateur de radicaux peroxydes sur des hématies, et, d'autre part, par le cuivre sur les lipoprotéines de basse densité (LDL), les extraits aqueux d'huîtres apparaissent présenter le potentiel anti-oxydant le plus intéressant.

Il a par ailleurs été proposé, dans les Demandes de Brevets Japonais publiées sous les n° 7-082132 et n° 7-102252, d'utiliser dans des compositions cosmétiques des hydrolysats préparés à partir de mucus d'huîtres, en tant qu'agents anti-oxydants propres à prévenir le vieillissement cutané et notamment l'apparition des rides. Ces hydrolysats sont obtenus en centrifugeant ou pressant des huîtres, après extraction de leurs coquilles et en éliminant la chair. Le mucus est alors soumis à une série de fractionnements par l'éthanol pour le débarrasser du chlorure de sodium qu'il renferme, puis à une protéolyse. Dans la Demande de Brevet Japonais n° 7-102252, le mucus, une fois hydrolysé, est soumis à une opération de dessalage complémentaire, toujours à l'aide d'éthanol, pour diminuer sa coloration.

Le coût de fabrication de tels hydrolysats est très élevé, notamment en raison des quantités non négligeables d'éthanol mises en jeu lors des opérations de dessalage et de la nécessité de disposer d'installations spécifiques et relativement onéreuses qu'impose l'utilisation de solvants organiques. De ce fait, indépendamment

du point de savoir s'ils présentent une activité antiradicalaire significative, il n'est pas souhaitable d'utiliser ce type d'hydrolysats pour la fabrication à une échelle industrielle de compositions antiradicalaires, en particulier si ces dernières sont destinées à être commercialisées en tant que compléments alimentaires.

5 Or, dans le cadre de leurs travaux, les Inventeurs ont constaté que des hydrolysats d'huîtres obtenus en soumettant de la chair d'huîtres à l'action d'une protéase dans des conditions appropriées, présentent de manière surprenante une activité antiradicalaire encore plus élevée que celle observée pour les extraits aqueux d'huîtres testés par DUSSART dans l'étude précitée, et sont donc susceptibles d'être 10 avantageusement utilisés pour la fabrication de compositions destinées à prévenir ou traiter les effets délétères des radicaux libres oxygénés.

La présente Invention a donc pour objet l'utilisation d'un hydrolysat enzymatique d'huîtres pour la préparation d'une composition antiradicalaire, cette utilisation étant caractérisée en ce que ledit hydrolysat est susceptible d'être obtenu par 15 hydrolyse de chair d'huîtres au moyen d'une protéase.

Selon une première disposition avantageuse de l'Invention, l'hydrolyse de la chair d'huîtres est réalisée par une protéase choisie parmi la subtilisine, la pepsine et la trypsine. En effet, outre que ces protéases ont un coût compatible avec une exploitation industrielle de l'Invention, elles présentent 20 l'avantage de faire partie des enzymes dont l'utilisation est autorisée dans de très nombreux pays pour la préparation d'hydrolysats protéiques entrant dans la fabrication de compléments alimentaires.

Dans la mesure où les protéases ne sont pas toutes actives dans les mêmes gammes de pH et de température, les conditions de pH et de température dans 25 lesquelles l'hydrolyse de la chair d'huîtres est effectuée dépendent de la protéase choisie pour réaliser cette hydrolyse.

De préférence, ces conditions de pH et de température sont telles qu'elles permettent d'obtenir une activité optimale de la protéase. Ainsi, par exemple, l'hydrolyse est conduite préférentiellement à un pH d'environ 8 et une température 30 d'environ 60°C dans le cas de la subtilisine, à un pH d'environ 2 et une température

d'environ 40°C dans le cas de la pepsine, et à un pH d'environ 8 et une température d'environ 37°C dans le cas de la trypsine.

Selon une autre disposition avantageuse de l'Invention, l'hydrolyse de la chair d'huîtres est effectuée pendant un temps suffisant pour que l'hydrolysat présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 30% et, de préférence, à 50%, ce degré d'hydrolyse protéique étant déterminé par la formule ci-après (ADLER-NISSEN, 1977, *Proc. Biochem.*, 12, 18-23) :

$$DH = (h/h \text{ total}) \times 100$$

10

dans laquelle :

- h total représente le nombre total de liaisons peptidiques présentes dans la chair d'huîtres au début de l'hydrolyse, tandis que
- h représente le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées au cours de l'hydrolyse, et est déterminé par la différence entre le nombre d'extrémités aminées (ou carboxyliques) libres présentes dans l'hydrolysat au terme de l'hydrolyse (h) et le nombre d'extrémités aminées (ou carboxyliques) libres présentes dans le broyat au début de l'hydrolyse (h_0).

Au sens de la présente Invention, le début de l'hydrolyse correspond au moment où la protéase est mise en contact avec la chair d'huîtres, tandis que son terme correspond au moment où l'hydrolyse est arrêtée par inactivation de ladite protéase, par exemple par dénaturation thermique ou par modification du pH.

Le nombre total de liaisons peptidiques (h total) présentes dans la chair d'huîtres peut être obtenu par la différence entre la quantité d'acides aminés totaux (libres + liés) et la quantité d'acides aminés libres que renferme cette chair. Ces quantités d'acides aminés totaux et libres peuvent être déterminées, par exemple au moyen d'une trousse telle que celle commercialisée sous la marque WATERS AccQ-Tag Chemistry Package® par la Société WATERS. Le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées (h) au cours de l'hydrolyse est, lui, obtenu par la différence entre la quantité d'extrémités aminées libres (h) présentes dans l'hydrolysat au terme de

l'hydrolyse et la quantité d'extrémités aminées libres (h_0) présentes dans la chair d'huîtres au début de l'hydrolyse, lesquelles peuvent être déterminées, par exemple, par réaction avec du fluorodinitrobenzène selon le protocole décrit dans *Biochem. J.*, 45, 563, 1949.

5 Là également, le temps qu'il convient de laisser l'hydrolyse se faire afin d'obtenir un hydrolysat présentant un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 30% et, de préférence, à 50%, dépend de la protéase choisie pour réaliser cette hydrolyse, et, pour une même protéase, des conditions de pH, de température dans lesquelles l'hydrolyse est conduite, ainsi que de la dose à laquelle cette protéase est 10 utilisée, l'hydrolyse s'effectuant, en effet, d'autant plus rapidement que la dose de protéase est plus élevée.

15 Selon encore une disposition avantageuse de l'Invention, l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant, préalablement à l'hydrolyse, une opération d'égouttage de la chair d'huîtres. Conformément à l'Invention, cette opération peut être réalisée en laissant simplement les huîtres, une fois extraites de leurs coquilles, reposer dans un égouttoir, de préférence à une température comprise entre 4 et 8°C pour prévenir toute altération de la chair, et ce, jusqu'à ce qu'il ne 20 s'écoule plus de liquide dudit égouttoir.

25 Selon une disposition préférée de l'Invention, l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant, préalablement à l'hydrolyse, une opération de broyage de la chair d'huîtres suivie éventuellement d'une opération de dilution dans l'eau du broyat résultant.

 De manière particulièrement préférée, l'opération de broyage est réalisée après une opération d'égouttage de la chair d'huîtres.

 Selon encore une autre disposition avantageuse de l'Invention, l'hydrolyse est arrêtée par dénaturation thermique de la protéase.

 Selon encore une autre disposition avantageuse de l'Invention, l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend, de plus, une opération de recueil de la phase liquide de l'hydrolysat tel qu'il se présente au terme de 30 l'hydrolyse. Ce recueil, qui est destiné à éliminer les différents débris (débris de

coquilles, débris membranaires, ...) susceptibles d'être présents dans cet hydrolysat, peut être réalisé par toutes les techniques classiquement utilisées pour séparer une phase liquide d'une phase solide telle que la centrifugation, l'ultracentrifugation, la filtration, la microfiltration, ces techniques pouvant être avantageusement combinées 5 entre elles.

Selon une autre disposition préférée de l'Invention, l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend les étapes suivantes :

- a) le broyage de chair d'huîtres préalablement égouttée,
- b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau 10 compris entre 30/70 et 70/30 (m/v), et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
- c) l'hydrolyse du broyat ainsi dilué par de la subtilisine à un pH d'environ 8 et à une température d'environ 60°C, pendant un temps suffisant pour que l'hydrolysat présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 50%,
- d) l'arrêt de l'hydrolyse par inactivation de la subtilisine, et
- e) le recueil de la phase liquide de l'hydrolysat.

Selon encore une autre disposition préférée de l'Invention, l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend les étapes suivantes :

- a) le broyage de chair d'huîtres préalablement égouttée,
- b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau 20 compris entre 30/70 et 70/30 (m/v), et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
- c) l'hydrolyse du broyat ainsi dilué par de la pepsine, à un pH d'environ 2 et à une température d'environ 40°C, pendant un temps suffisant pour que l'hydrolysat présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 50%,
- d) l'arrêt de l'hydrolyse par inactivation de la pepsine, et
- e) le recueil de la phase liquide de l'hydrolysat.

Selon encore une autre disposition préférée de l'Invention, l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend les étapes suivantes :

- 30 a) le broyage de chair d'huîtres préalablement égouttée,

b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v), et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),

c) l'hydrolyse du broyat ainsi dilué par de la trypsine, à un pH d'environ 8 et à une température d'environ 37°C, pendant un temps suffisant pour que
5 l'hydrolysat présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 50%,

d) l'arrêt de l'hydrolyse par inactivation de la trypsine, et

e) le recueil de la phase liquide de l'hydrolysat.

De tels hydrolysats enzymatiques d'huîtres présentent des propriétés antiradicalaires qui, outre d'être prononcées, sont extrêmement intéressantes puisqu'ils s'avèrent être capables, non seulement de neutraliser les effets des radicaux libres oxygénés produits au cours de réactions de peroxydation, mais également d'empêcher la formation de ces radicaux libres par ce qui apparaît être un mécanisme de chélation des métaux comme par exemple le cuivre, qui sont impliqués dans la genèse desdits radicaux libres.

15 De plus, ils présentent l'avantage de pouvoir être obtenus par un procédé simple à mettre en oeuvre et économiquement compatible avec les impératifs industriels, notamment en raison de ce qu'il ne requière l'utilisation daucun solvant organique.

20 Ces hydrolysats sont donc susceptibles d'être avantageusement utilisés pour la préparation :

– de compositions pharmaceutiques destinées à traiter les pathologies apparaissant liées à un déséquilibre entre la production et la destruction des radicaux libres oxygénés telles que précédemment évoquées,

25 – de compléments alimentaires propres à être utilisés, soit en tant qu'adjutants à un traitement médical, soit à titre préventif, notamment par des personnes chez lesquelles il est souhaitable de renforcer les mécanismes naturels de défense contre les radicaux libres oxygénés, parce que ces moyens de défense sont physiologiquement diminués (personnes âgées, personnes souffrant de déficits alimentaires en vitamines et oligo-éléments, ...) ou parce que ces personnes sont
30 amenées à se trouver dans des situations favorisant la formation excessive de radicaux

libres oxygénés (exposition intense au soleil, exposition aux produits chimiques, ...), ou encore

– de compositions cosmétiques visant à prévenir ou à traiter le vieillissement cutané dont l'origine est en grande partie liée aux radicaux libres générés au niveau de la peau par les rayonnements ultraviolets.

A cette fin, ils peuvent être utilisés soit tels quels, c'est-à-dire sous forme aqueuse ou éventuellement sous la forme de poudres sèches obtenues par exemple, par lyophilisation, soit en mélange avec des excipients physiologiquement acceptables et/ou d'autres substances actives et, notamment, des substances ayant également des propriétés antiradicalaires intrinsèques, et capables d'agir de manière synergique (vitamines A, C ou E, par exemple), au sein de formulations plus complexes.

Outre les dispositions qui précédent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront du complément de description qui suit, qui se rapporte à des exemples illustrant l'activité hydrolytique d'enzymes sur des broyats de chair d'huîtres, la préparation d'hydrolysats enzymatiques de chair d'huîtres ainsi que les propriétés biologiques de ces hydrolysats, et qui se réfère aux dessins annexés dans lesquels :

– la Figure 1 représente la cinétique de deux hydrolyses conduites sur des broyats de chair d'huîtres avec deux doses différentes de subtilisine ; tandis que

– la Figure 2 représente la cinétique d'une hydrolyse conduite sur un broyat de chair d'huîtres avec de la pepsine.

Il va de soi, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustrations de l'objet de l'Invention et n'en constituent en aucune manière une limitation

EXAMPLE 1 : Etude de l'activité hydrolytique de la subtilisine sur des broyats de chair d'huîtres

Des huîtres creuses *Crassostrea gigas* vivantes, provenant de la station conchylicole expérimentale IFREMER de Bouin (VENDEE - FRANCE), après

extraction de leurs coquilles, sont égouttées sur un tamis métallique pendant 1 heure à une température comprise entre 4 et 8°C, puis broyées pendant 2 minutes à 1 000 tr/minute à l'aide d'un Ultra-Turrax® (de puissance maximale égale à 170 W à 2 000 tr/minute).

5 Le broyat obtenu, après une éventuelle conservation à une température de -20°C et, dans ce cas, une décongélation, est introduit dans un réacteur. Il est additionné, sous agitation, de 60% (v/m) d'eau désionisée. Puis, on introduit dans le réacteur, toujours sous agitation, une dose de 14 UA (unités actives) ou de 38 UA de subtilisine (commercialisée sous la marque alcalase® 2.4L par la
10 Société NOVO NORDISK) par kg du mélange qu'il contient. La température du réacteur est maintenue à 60°C pendant toute la durée de l'hydrolyse, soit pendant 4 heures. L'agitation est également maintenue et le pH est régulé à l'aide d'un pH-stat de manière à être constamment à une valeur de 8.

15 Au terme des 4 heures d'hydrolyse, l'activité de la subtilisine est arrêtée par dénaturation thermique de cette dernière, en plaçant le mélange réactionnel dans un bain-marie à 90°C pendant 25 minutes.

Des échantillons sont prélevés dans le réacteur, au moyen d'une pompe péristaltique, juste avant que n'y soit introduite la subtilisine (t_0), puis 15 et 30 minutes après l'introduction de cette enzyme dans le réacteur (soit à t_{15} et t_{30}), puis
20 toutes les 30 minutes et ce, jusqu'à l'arrêt de l'hydrolyse (soit à t_{60} , t_{90} , t_{120} , t_{150} , t_{180} , t_{210} et t_{240}). Les échantillons qui renferment de la subtilisine sont placés dans un bain-marie à 90°C pendant 25 minutes de manière à stopper l'activité de cette dernière. Puis, tous les échantillons sont soumis à une centrifugation à 13 000 tr/minute. Les surnageants sont filtrés sur une membrane de 0,7 µm, puis sur une membrane de 0,16 µm.

25 L'activité hydrolytique de la subtilisine est appréciée en suivant :

- d'une part, l'évolution de la concentration des broyats en extrémités aminées libres entre t_{15} et t_{240} , en dosant ces extrémités par réaction avec du fluorodinitrobenzène, ce suivi permettant d'établir la cinétique de l'hydrolyse, et
- d'autre part, l'évolution du degré d'hydrolyse protéique (DH) des
30 broyats entre t_{15} et t_{240} , ce degré d'hydrolyse protéique étant calculé selon la formule

DH = (h/h total) x 100, dans laquelle h total est obtenu par le dosage des acides aminés totaux et libres présents dans les broyats à l'aide d'une trousse WATERS AccQ-Tag Chemistry Package®, tandis que h est déterminé par le dosage des extrémités aminées libres présentes dans les échantillons prélevés à t_{15} , t_{30} , ..., jusqu'à 5 t_{240} inclus, par réaction avec du fluorodinitrobenzène.

La Figure 1 représente la cinétique de l'hydrolyse conduite avec la dose de subtilisine de 14 UA/kg (■) et celle conduite avec la dose de subtilisine de 38 UA/kg (◆), les valeurs des concentrations en extrémités aminées libres étant exprimées en ordonnées et en mM, le temps étant exprimé en abscisses et en minutes.

Cette Figure montre que l'hydrolyse est plus rapide lorsque la dose de subtilisine est augmentée. Ainsi, le plateau est atteint au bout de 90 minutes d'hydrolyse pour la dose de 14 UA/kg, et ce délai est réduit à 60 minutes pour la dose de 38 UA/kg. Toutefois, la concentration en extrémités aminées libres pour laquelle le plateau est atteint est similaire pour les deux doses d'enzyme. Il en est de même de la 10 concentration finale en extrémités aminées libres (environ 120 mM).
15

Le Tableau I ci-après présente les valeurs des degrés d'hydrolyse protéique (DH), exprimées en pourcentages, obtenues pour chacune des doses de subtilisine.

20

25

30

TABLEAU I

Temps (minutes)	DH (%)	
	14 UA/kg	38 UA/kg
15	14	-
30	23	31
60	34	46
90	45	48
120	47	51
150	50	51
180	47	56
210	54	54
240	54	58

Ce Tableau montre que, quelle que soit la dose de subtilisine utilisée, la vitesse d'hydrolyse diminue lorsque 45% des liaisons peptidiques potentiellement hydrolysables ont été rompues. L'hydrolyse se poursuit toutefois, mais de manière discrète, puisque les valeurs finales du degré d'hydrolyse protéique dépassent 50%, pour atteindre 54% dans un cas, et 58% dans l'autre cas.

EXEMPLE 2 : Etude de l'activité hydrolytique de la pepsine sur des brovats de chair d'huîtres

L'activité hydrolytique de la pepsine sur des broyats de chair d'huîtres est appréciée en utilisant un protocole opératoire identique à celui utilisé dans l'exemple 1, à ceci près que l'hydrolyse est conduite avec une dose de 1% en masse de pepsine rapportée à la masse totale du mélange broyat/eau désionisée présent dans le réacteur, à une température de 40°C et à un pH égal à 2.

La Figure 2 représente la cinétique de l'hydrolyse ainsi obtenue, les valeurs des concentrations en fonctions amines libres étant exprimées en ordonnées et en mM, le temps étant exprimé en abscisses et en minutes.

Cette Figure montre que l'hydrolyse s'effectue nettement plus rapidement que lorsqu'elle est conduite avec de la subtilisine, même à la dose de 38 UA/kg, puisque le plateau est atteint 30 minutes après l'introduction de la pepsine dans le réacteur. Toutefois, la concentration finale en fonctions amines libres dans 5 l'hydrolysat, qui se situe aux environs de 120 mM, est tout à fait comparable à celle obtenue lorsque l'hydrolyse est conduite avec de la subtilisine.

EXEMPLE 3 : Préparation d'hydrolysats enzymatiques de chair d'huîtres par utilisation de la subtilisine

Sur la base des résultats obtenus dans l'étude objet de l'exemple 1, 10 on prépare deux hydrolysats présentant des degrés d'hydrolyse protéique différents – qui seront dénommés ci-après respectivement hydrolysat A et hydrolysat B – en soumettant deux broyats de chair d'huîtres préalablement égouttée à une hydrolyse par de la subtilisine.

Les broyats de chair d'huîtres sont préparés et les hydrolyses sont 15 conduites dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'exemple 1, en utilisant une dose de subtilisine de 38 UA par kg de mélange broyat/eau désionisée.

Pour l'hydrolysat A, l'hydrolyse est arrêtée 4 heures après l'introduction de l'enzyme dans le réacteur, de manière à ce qu'il présente un degré d'hydrolyse protéique maximal, soit proche de 60%.

20 Pour l'hydrolysat B, l'hydrolyse est arrêtée 30 minutes après introduction de l'enzyme dans le réacteur, afin qu'il présente un degré d'hydrolyse protéique sensiblement égal à la moitié du degré d'hydrolyse protéique maximal, soit d'environ 30%.

Dans les deux cas, l'activité hydrolytique de la subtilisine est 25 stoppée en plaçant les mélanges réactionnels dans un bain-marie à 90°C pendant 25 minutes. Les mélanges sont ensuite centrifugés à 4 000 tr/minute. Les surnageants sont filtrés sur une membrane de 0,7 µm, puis sur une membrane de 0,16 µm. Les hydrolysats ainsi préparés présentent un aspect granuleux de couleur brun-vert. Ils sont lyophilisés et placés dans des flacons à -20°C.

EXEMPLE 4 : Caractérisation biochimique d'un hydrolysat enzymatique de chair d'huîtres obtenu conformément à l'Invention

On réalise une étude visant à déterminer pour l'hydrolysat A préparé selon l'exemple 3 :

- 5 - sa teneur en matière sèche,
 - sa teneur en matière minérale,
 - sa teneur en protéines solubles,
 - sa teneur en sucres totaux et en glycogène, ainsi que
 - sa teneur et sa composition en acides aminés totaux et en acides

10 aminés libres,

et à comparer les résultats avec ceux obtenus, dans les mêmes conditions, d'une part, pour un broyat de chair d'huîtres préparé comme décrit dans l'exemple 1 et d'autre part, pour un extrait aqueux d'huîtres préparé :

- 15 • en mélangeant un broyat de chair d'huîtres avec de l'eau désionisée (1/3, v/v) jusqu'à obtenir un mélange homogène, puis
 • en soumettant le mélange résultant à une centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes, et
 • en lyophilisant le surnageant recueilli au terme de cette centrifugation.

20 La teneur en matière sèche est déterminée en plaçant des échantillons de l'hydrolysat A à une température de 100°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (6 heures minimum), et en calculant le pourcentage représenté par ce poids par rapport au poids initial de ces échantillons.

25 La teneur en matière minérale est déterminée en incinérant des échantillons de l'hydrolysat A à une température de 600°C pendant 12 heures, et en calculant le pourcentage représenté par le poids du résidu par rapport au poids de la matière sèche.

30 Les protéines solubles sont dosées à l'aide de la trousse commercialisée par la Société PIERCE sous la dénomination commerciale BCA® Protein Assay Reagent. L'albumine bovine est utilisée comme étalon.

Les sucres totaux et le glycogène sont dosés selon la méthode décrite par M. DUBOIS et al. (*Anal. Chem.*, 1956, 28, 350-356). Pour ces dosages, les échantillons sont préalablement délipidés selon la méthode de E. G. BLIGHT et W. J. DYER (*Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37, 911-917).

La teneur et la composition en acides aminés totaux et en acides aminés libres sont, quant à elles, déterminées à l'aide d'une trousse WATERS AccQ-Tag Chemistry Package®. Pour le dosage des acides aminés totaux, les échantillons de l'hydrolysat A sont préalablement soumis à une hydrolyse acide, par action d'HCl 6N pendant 12 heures, à 110°C et sous vide, tandis que, pour le dosage des acides aminés libres, les échantillons de l'hydrolysat A sont préalablement additionnés d'acide sulfo-salicilique et centrifugés de manière à provoquer une précipitation des protéines présentes dans ces échantillons. ▷

Le Tableau II ci-après présente les teneurs en matière sèche, en matière minérale, en protéines solubles, en sucres totaux, en glycogène, en acides aminés totaux et en acides aminés libres présentées respectivement par l'hydrolysat A, le broyat d'huîtres et l'extrait aqueux d'huîtres.

Les teneurs en matière sèche sont exprimées en pourcentages par rapport au poids lyophilisé (% p/p) des échantillons, sauf dans le cas du broyat où la matière sèche est exprimée en pourcentage par rapport au poids frais (% p/p*) des échantillons. Les teneurs en matière minérale, en protéines solubles, en sucres totaux, en glycogène, en acides aminés totaux et en acides aminés libres sont exprimées en pourcentages par rapport aux poids sec (% p/p) des échantillons.

TABLEAU II

	Hydrolysat A	Broyat	Extrait aqueux
Matière sèche (% p/p)	96,23 (% p/p)	10,20 (% p/p*)	95 (% p/p)
Matière minérale (% p/p)	36,43	37,33	37
Protéines solubles (% p/p)	13,25	30	15
Sucres totaux (% p/p)	8,52	6,63	3,7
Glycogène (% p/p)	1,29	1	1,5
Acides aminés totaux (% p/p)	35,1	36,7	20,15
Acides aminés libres (% p/p)	17,8	7	8,10

Le Tableau III ci-après présente, lui, les compositions en acides aminés totaux et libres de l'hydrolysat A, du broyat d'huîtres et de l'extrait aqueux d'huîtres. Les teneurs de chaque acide aminé sont exprimées en pourcentages par rapport au poids total (% p/p) des acides aminés présents dans les échantillons.

TABLEAU III

Acides aminés	HYDROLYSAT A		BROYAT		EXTRAIT AQUEUX	
	AA totaux (% p/p)	AA libres (% p/p)	AA totaux (% p/p)	AA libres (% p/p)	AA totaux (% p/p)	AA libres (% p/p)
Taurine	10,67	19,25	11,48	55,98	30,47	60,66
Hydroxyproline	—	—	—	—	—	—
Acide aspartique	10,08	2,45	10,43	4,79	11,26	0,72
Thréonine	5,02	4,07	4,79	—	4,16	—
Sérine	4,67	6,58	5,02	2,28	4,46	2,21
Acide glutamique	13,26	8,08	13,49	8,60	11,91	11,46
Proline	5,12	2,20	4,85	7,59	—	—
Glycine	6,31	3,61	6,49	6,81	5,31	5,05
Alanine	5,64	6,43	4,39	3,21	5,80	8,01
Cystéine	—	—	—	—	—	—
Valine	4,51	4,94	4,16	0,42	2,77	—
Méthionine	2,13	2,76	2,06	—	1,53	—
Isoleucine	4,02	4,38	3,36	—	2,58	—
Leucine	6,18	7,63	6,32	0,65	4,66	—
Tyrosine	3,39	5,04	3,27	—	1,73	2,95
Phénylalanine	3,53	4,71	3,29	0,26	2,72	—
Hydroxylysine	—	—	—	—	—	—
Lysine	6,28	7,00	7,04	3,59	5,21	0,73
Histidine	2,33	2,92	2,92	1,70	1,24	—
Arginine	6,86	7,94	6,65	4,11	4,16	1,72

Le Tableau II montre que l'hydrolysat A présente une teneur en sucres totaux supérieure à celles retrouvées dans le broyat et dans l'extrait aqueux. Cet accroissement est dû à la déstructuration des tissus provoquée par l'hydrolyse enzymatique, permettant ainsi une plus forte solubilisation des sucres. La diminution de la teneur en protéines solubles que l'on observe entre le broyat et l'hydrolysat est une conséquence de l'hydrolyse des protéines natives. Cette hydrolyse génère une quantité importante de peptides et d'acides aminés libres qui réagissent peu avec le réactif utilisé pour le dosage des protéines solubles (BCA®). Par contre, la teneur en matières minérales ne varie pas entre les trois préparations.

Par ailleurs, il résulte du Tableau II que la teneur en acides aminés libres de l'hydrolysat A est notablement plus élevée que la teneur en acides aminés libres de l'extrait aqueux d'huîtres, cette dernière étant très proche de celle retrouvée pour le broyat de chair d'huîtres. L'augmentation de la quantité d'acides aminés libres présents dans l'hydrolysat A est directement liée à la rupture des liaisons peptidiques provoquée par la réaction d'hydrolyse.

Toutefois, au vu du Tableau III, il apparaît que la proportion de taurine libre, qui est connue pour présenter une activité anti-oxydante, est plus faible dans l'hydrolysat A que dans l'extrait aqueux d'huîtres. En effet, la taurine sous forme libre représente 60,66% des acides aminés libres dans l'extrait aqueux d'huîtres contre seulement 19,25% dans l'hydrolysat A.

EXEMPLE 4 : Activité biologique des hydrolysats enzymatiques de chair d'huîtres obtenus conformément à l'Invention

L'activité biologique des hydrolysats A et B préparés selon l'exemple 3 est appréciée par une série d'expérimentations visant à tester :

- d'une part, l'aptitude de ces hydrolysats à inhiber l'hémolyse induite par l'introduction d'un générateur de radicaux peroxydes, à savoir le 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) dichlorhydrique (AAPH), dans une suspension d'hématies, et
– d'autre part, l'aptitude de ces hydrolysats à protéger les lipoprotéines de basse densité, plus connues sous la terminologie anglaise "*Low Density Lipoproteins*" (LDL) contre une oxydation induite par le cuivre.

4.1 - Inhibition de l'hémolyse induite par l'AAPH :**a) Protocole :**

5 ml de sang humain sont prélevés sur tube EDTA (lequel est immédiatement placé dans de la glace pilée) et centrifugés pendant 10 minutes, à 5 1 000 g et à 4°C. Le plasma est éliminé et les hématies sont lavées 3 fois avec une solution de NaCl à 9% ou avec du tampon PBS (pH 7,4). 200 µl du culot cellulaire d'hématies sont ensuite dilués dans 9,8 µl de solution de NaCl à 9% ou de tampon PBS.

Dans un premier temps, la suspension globulaire obtenue est mise en 10 contact pendant 10 minutes avec les solutions (NaCl 9% ou PBS) d'hydrolysats A ou B dont le volume est calculé de manière à ce que la solution finale corresponde à 25, 50 et 100 mg/l. Un échantillon sans hydrolysat constitue le témoin.

15 300 µl d'une solution d'AAPH ayant préalablement été mise à incuber à 37°C sont alors introduits dans les suspensions d'hématies et l'ensemble est disposé sous agitation douce au bain-marie pendant 40 minutes.

Un échantillon de la suspension d'hématies (sans AAPH ou produit) est parallèlement disposé pendant 1 heure à -80°C.

La lyse des hématies est appréciée en mesurant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) à l'aide d'un automate HITACHI® 911. Chaque mesure est 20 réalisée en double.

L'activité LDH déterminée sur les échantillons disposés à -80°C correspond à l'hémolyse totale des hématies.

25 L'activité LDH déterminée sur les échantillons ne contenant pas d'hydrolysat correspond à la sensibilité des hématies au "stress radicalaire" dans les conditions expérimentales. Cette mesure permet par ailleurs de vérifier que les conditions expérimentales (hémolyse < 100 %) sont convenables pour l'étude.

Pour chaque concentration d'hydrolysat, l'activité LDH est comparée à l'activité des échantillons ne contenant pas de produit et exprimée en pourcentage d'activité.

b) Résultats :

Le Tableau IV ci-après présente la moyenne des pourcentages d'inhibition (Ia) obtenus pour des solutions de 25, 50 et 100 mg/l d'hydrolysat A et d'hydrolysat B.

5

TABLEAU IV

Concentration (mg/l)	Ia (%)	
	Hydrolysat A	Hydrolysat B
25	38	25
50	74	48
100	96	98

Ce Tableau montre que les hydrolysats enzymatiques de chair d'huîtres obtenus conformément à l'Invention présentent une aptitude marquée à inhiber l'hémolyse induite par l'introduction d'un générateur de radicaux peroxydes au sein d'une suspension d'hématies – ce qui signifie qu'ils sont capables de neutraliser les effets oxydants de ces radicaux peroxydes –, puisque la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) de l'hydrolysat A est comprise entre 25 et 50 mg/l, tandis que celle de l'hydrolysat B s'élève à 50 mg/l.

15 A titre de comparaison, la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) obtenue par DUSSART (*ibid*) pour un extrait aqueux d'huîtres est de 275 mg/l.

4.2 – Protection des LDL contre une oxydation induite par le cuivre :

a) Protocole :

Les LDL sont préparées à partir de 100 ml de plasma (sang prélevé 20 sur EDTA). Dans un premier temps, les VLDL sont éliminées par ultracentrifugation, 24 heures à 40 000 g (densité : 1,019). Une seconde ultracentrifugation, 24 heures à 40 000 g (densité : 1,063) permet l'obtention des LDL. Les LDL sont alors dialysées

pendant 24 heures à 4°C contre du tampon TRIS-EDTA, aliquotées puis conservées à 4°C.

Les LDL (0,2 mg de protéines/ml de solution), préalablement dialysées contre du tampon PBS, sont mises à incuber 24 heures à 37°C en présence 5 de cuivre (oxydant) et en présence ou non des produits étudiés.

Pour chaque étude, 3 déterminations sont donc réalisées parallèlement :

- LDL en absence de cuivre (témoin LDL natives),
- LDL en présence de 5 µM de sulfate de cuivre (témoin LDL 10 oxydées),
- LDL en présence de 5 µM de sulfate de cuivre et de concentrations croissantes des hydrolysats A et B.

Après arrêt de l'oxydation par du BHT/EDTA, la solution de LDL est dialysée 24 heures à + 4°C et filtrée sur membrane "millipore" de 0,2 µm.

15 L'effet inhibiteur des hydrolysats vis à vis de l'oxydation des LDL par le cuivre est quantifié par le dosage de 2 marqueurs de lipoperoxydation :

- le MDA (malondialdéhyde), pour le calcul du pourcentage d'inhibition Ib,
- les hydroperoxydes, pour le calcul du pourcentage d'inhibition 20 Ic.

- Dosage du MDA

Le MDA forme avec l'acide thiobarbiturique, à chaud et en milieu acide, un complexe chromogène fluorescent. Après extraction par le butanol normal, l'intensité de la fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Les 25 concentrations de MDA sont déterminées au moyen d'une gamme de MDA s'étendant de 0,2 à 1 nmole.

- Dosage des hydroperoxydes

Les hydroperoxydes libèrent l'iode à partir d'une solution stabilisée d'iodure de potassium. L'iode libéré est mesuré par détermination de la densité 30 optique (DO) à 365nm.

La concentration en iode de l'échantillon est ensuite calculée à partir du coefficient d'extinction ϵ ($=2,46 \cdot 10^4$, 1cm, 1M) de cet élément.

b) Résultats :

Les Tableaux V et VI ci-après présentent respectivement les pourcentages d'inhibition (Ib) et (Ic) tels qu'obtenus pour des solutions de 25, 50, 100 et 250 mg/l d'hydrolysat A et d'hydrolysat B.

TABLEAU V

Concentration (mg/l)	Ib (%)	
	Hydrolysat A	Hydrolysat B
25	-9	40
50	75	82
100	73	86
250	86	89

TABLEAU VI

Concentration (mg/l)	Ic (%)	
	Hydrolysat A	Hydrolysat B
25	10	71
50	100	100
100	100	100
250	100	100

Ces Tableaux montrent que les hydrolysats enzymatiques de chair d'huîtres obtenus conformément à l'Invention ont également une aptitude prononcée à s'opposer à une oxydation des LDL induite par le cuivre, aptitude qui pourrait être liée à un effet chélateur vis-à-vis des métaux.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un hydrolysat enzymatique d'huîtres pour la préparation d'une composition antiradicalaire, caractérisée en ce que ledit hydrolysat est susceptible d'être obtenu par hydrolyse de chair d'huîtres au moyen d'une protéase.

5 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'hydrolyse est effectuée au moyen d'une protéase choisie parmi la subtilisine, la pepsine et la trypsine.

10 3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que l'hydrolyse est effectuée pendant un temps suffisant pour que l'hydrolysat présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 30% et, de préférence, à 50%, ce degré d'hydrolyse protéique étant déterminé par la formule ci-après :

$$DH = (h/h \text{ total}) \times 100$$

15 dans laquelle :

- h total représente le nombre total de liaisons peptidiques présentes dans la chair d'huîtres au début de l'hydrolyse, tandis que
- h représente le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées au cours de l'hydrolyse, et est déterminé par la différence entre le nombre d'extrémités aminées libres présentes dans l'hydrolysat au terme de l'hydrolyse (h) et le nombre d'extrémités aminées libres présentes dans la chair d'huîtres au début de l'hydrolyse (h_0).

20 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant, préalablement à l'hydrolyse, une opération d'égouttage de la chair d'huîtres.

25 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant, préalablement à l'hydrolyse, une opération de broyage de la chair

d'huîtres suivie éventuellement d'une opération de dilution dans l'eau du broyat résultant.

6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'opération de broyage est réalisée après une opération d'égouttage de la chair d'huîtres.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'hydrolyse est arrêtée par dénaturation thermique de la protéase.

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant, postérieurement à l'hydrolyse, une opération de recueil de la phase liquide de l'hydrolysat.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 3 à 8, caractérisé en ce que l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- 15 a) le broyage de chair d'huîtres préalablement égouttée,
- b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v) et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
- c) l'hydrolyse du broyat ainsi dilué par de la subtilisine, à un pH d'environ 8 et à une température d'environ 60°C, pendant un temps suffisant pour que
- 20 l'hydrolysat présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 50%,
- d) l'arrêt de l'hydrolyse par inactivation de la subtilisine, et
- e) le recueil de la phase liquide de l'hydrolysat.

10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 3 à 8, caractérisé en ce que l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- 25 a) le broyage de chair d'huîtres préalablement égouttée,
- b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v) et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),

- c) l'hydrolyse du broyat ainsi dilué par de la pepsine, à un pH d'environ 2 et à une température d'environ 40°C, pendant un temps suffisant pour que l'hydrolysat présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 50%,
5 d) l'arrêt de l'hydrolyse par inactivation de la pepsine, et
e) le recueil de la phase liquide de l'hydrolysat.

11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 3 à 8, caractérisée en ce que l'hydrolysat est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) le broyage de chair d'huîtres préalablement égouttée,
10 b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v) et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
c) l'hydrolyse du broyat ainsi dilué par de la trypsine, à un pH d'environ 8 et à une température d'environ 37°C, pendant un temps suffisant pour que l'hydrolysat présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 50%,
15 d) l'arrêt de l'hydrolyse par inactivation de la trypsine, et
e) le recueil de la phase liquide de l'hydrolysat.

12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition antiradicalaire est une composition pharmaceutique, un complément alimentaire ou une composition cosmétique.

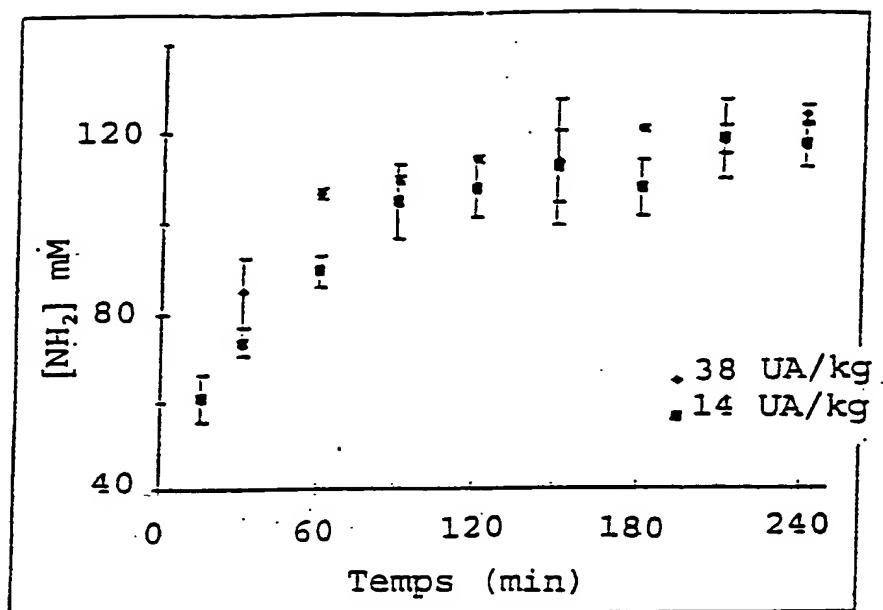


Fig. 1

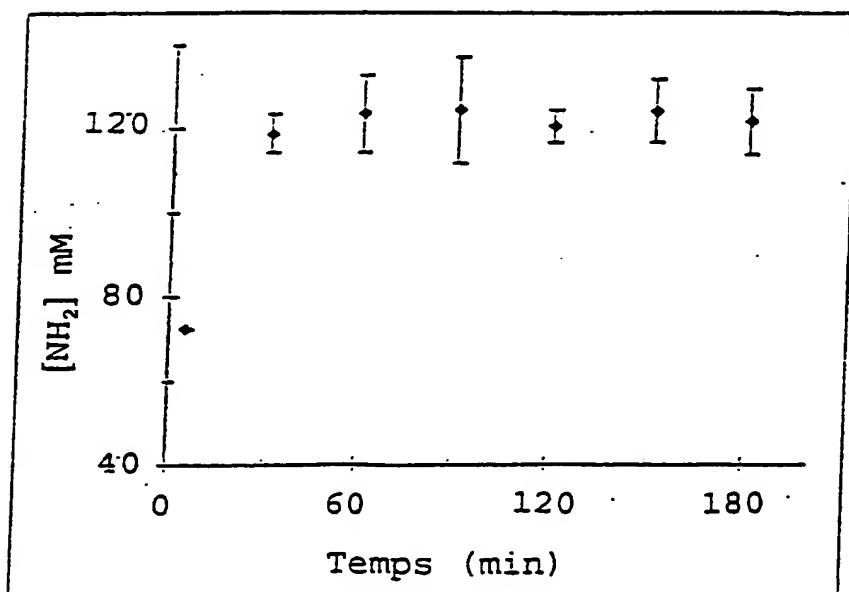


Fig. 2

